



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 106 183**

⑤① Int. Cl.⁶: A61K 39/395

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **92909065.2**

⑧⑥ Fecha de presentación : **24.04.92**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 583 281**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.94**

⑤④ Título: **Suero antiveneno.**

③① Prioridad: **02.05.91 GB 91094789**

⑦③ Titular/es: **Therapeutic Antibodies Inc.**
The Village at Vanderbilt, 1500
21st Avenue South, Suite 310
Nashville, Tennessee 37212, US

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.11.97

⑦② Inventor/es: **Smith, Damon Charles**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.11.97

⑦④ Agente: **Ungría Goiburu, Bernardo**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 106 183 T3

BEST AVAILABLE COPY

DESCRIPCION

La presente invención se refiere a antivenenos y a procedimientos para su preparación. Más en particular, la invención se refiere a antivenenos de serpiente y a procedimientos para su preparación.

Existe un cierto número de animales, entre ellos las serpientes, lagartos gila, arañas y abejas, que producen venenos peligrosos para el hombre. Por ejemplo, aproximadamente un millón de personas al año en todo el mundo sufren la mordedura de serpientes venenosas. Se ha calculado que, de éstas, unas 100.000 mueren y otras 300.000 sufren alguna forma de discapacidad para el resto de sus vidas. Esto probablemente representa una subestimación debido a la falta de registros detallados en algunas partes del mundo.

Algunos venenos de serpiente, producidos principalmente para procurarse víctimas o para una función defensiva, son mezclas biológicas complejas de hasta 50 componentes. La muerte de una víctima de mordedura de serpiente se debe a un fallo respiratorio o circulatorio causado por diversas neurotoxinas, cardiotoxinas (llamadas también citotoxinas), factores de coagulación, y otras sustancias que actúan solas o de forma sinérgica. Los venenos de serpiente contienen también un cierto número de enzimas que cuando se inyectan en la víctima inician la digestión de los tejidos. Los venenos contienen, según esto, sustancias destinadas a afectar a los procesos vitales tales como la función nerviosa y la función muscular, la actividad del corazón, la circulación de la sangre y la permeabilidad de las membranas. La mayor parte de los constituyentes de los venenos de serpientes son proteínas, pero están presentes también compuestos de bajo peso molecular tales como péptidos, nucleótidos e iones metálicos (1).

Las serpientes venenosas se pueden dividir en 4 familias principales:

TABLA 1.1
Clasificación de serpientes venenosas

Clase: <i>Reptilla</i> (reptiles) Orden: <i>Squamata</i> (serpientes y lagartos) Suborden: <i>Serpentes</i> (serpientes) Infra-orden: <i>Aletinophidia</i> (serpientes de anteojos) Familia superior: <i>Colubroidea</i> (serpientes superiores)		
Familia	Subfamilia	Grupo
<i>Colubridae</i> (serpientes colúbridos)	<i>Natricinae</i>	(serpientes de agua natricinas)
	<i>Dispholidinae</i>	(serpientes africanas con diente posterior)
	<i>Atractaspidinae</i>	(víboras de falsa madriguera)
<i>Elapidae</i> (erectores palatinos)	<i>Bungarinae</i> (cobras)	<i>Bungarini</i> (karaites) <i>Najini</i> (cobras)
	<i>Elapinae</i>	<i>Elapini</i> (Coral americana) <i>Maticorini</i> (Coral asiática) <i>Laticaudini</i> (karait de mar)
<i>Hydrophidae</i> (reptadores palatinos)	<i>Oxiuraninae</i> (serpientes venenosas de Asia Austral)	
	<i>Hydrophinae</i> (verdaderas serpientes de mar)	<i>Ephalophini</i> <i>Hydrelapini</i> <i>Aipysurini</i> <i>Hydrophiini</i>

TABLA 1.1 (Continuación)

5	Familia	Subfamilia	Grupo
10	<i>Viperidae</i> (víboras)	<i>Viperinae</i> (víboras sin pitón)	<i>Viprini</i> (verdaderas víboras) <i>Azemiopini</i> (víbora de Fea) <i>Causini</i> (culebras nocturnas)
		<i>Crotalinae</i> (víboras pitón)	<i>Lachesini</i> (lachesis muta) <i>Crotalini</i> (serpiente pitón vivípara)

15 TABLA 1.2
Clasificación y distribución geográfica de la familia de las Crotalinae

20	Grupo	Género	Habitat
	<i>Lachesini</i>	<i>Lachesis</i> (lachesis muta)	América Central y América del Sur
25	<i>Crotalini</i>	<i>Crotalus</i> (serpientes de cascabel)	América del Norte, Central y del Sur
30		<i>Sistrurus</i> (serpientes massauga y serpiente cascabel enana)	América del Norte
		<i>Bothrops</i> (víboras pitón del Nuevo Mundo)	América Central y América del Norte
35		<i>Trimeresurus</i> (víboras pitón asiáticas)	Asia y América del Norte
40		<i>Hipnale</i>	Asia
45		<i>Agkistrodon</i> (Moccasin)	América del Norte, Sudeste de Europa y Asia

Estas familias principales son: las *Colubridae*, las *Viperidae*, las *Hidrophidae* y las *Elapidae* (2). La sistemática de estas serpientes está descrita en las Tablas 1.1 y 1.2. Las serpientes cascabel que son en particular del Continente Americano pertenecen a la subfamilia de serpientes venenosas de la familia de las *Viperidae* conocidas como *Crotalinae*, género *Crotalus* o *Sistrurus* (serpientes cascabel) *Bothrops*, *Agkistrodon*, y *Trimerisurus*. Los dos géneros de serpientes cascabel pueden dividirse además en especies y subespecies. Estas serpientes se conocen también como víboras pitón debido a la presencia de fosas sensoriales de celo faciales, aunque su característica más sobresaliente es el cascabel que cuando está presente las distingue de las demás serpientes.

Cada especie o subespecie ocupa una zona geográfica clara en América del Norte o del Sur. El veneno de cada especie de serpiente cascabel contiene componentes que pueden ser comunes a todas las serpientes cascabel, comunes solo a grupos más pequeños o puede ser específico para especies o subespecies singulares (3).

El antiveneno es el suero o una fracción anticuerpo parcialmente purificada de suero de los animales que se han hecho inmunes a la toxicidad del veneno como resultado de un régimen de inyecciones de dosis

crecientes de veneno de serpiente.

El estudio científico de un antiveneno comenzó con el trabajo de Henry Swell (5) en 1887 y se ha desarrollado a través de este siglo. Actualmente, se producen en todo el mundo un gran número y variedad de antivenenos monoespecíficos y poliespecíficos.

Tal como aquí se emplea, el término "antiveneno monoespecífico" se refiere a un antiveneno provocado frente al veneno de una sola especie o subespecie del animal venenoso. El término "antiveneno poliespecífico" se refiere a un antiveneno frente a una mezcla de dos o más venenos de diferentes especies o subespecies del animal venenoso.

Los términos antisueros monoespecífico y poliespecífico se utilizan aquí con el fin de evitar la confusión causada por el uso de expresiones alternativas comunes de antisueros 'monovalente' y 'polivalente'. Esta terminología se utiliza porque el término "valencia" es utilizado por los inmunólogos para expresar el número de sedes de unión que posee un anticuerpo o producto de digestión de un anticuerpo, siendo de este modo una molécula de IgG divalente mientras que un fragmento F(ab), que únicamente tiene una sede de unión, es monovalente. El empleo del término "especificidad" para describir un antisero evita cualquier confusión.

En el trabajo pionero de Sewell, se inocularon palomas con dosis subletales de veneno de serpiente cascabel seguido de inyecciones de dosis crecientes hasta niveles por encima de los cuales, si fueran inyectados inicialmente, causarían la muerte. Se demostró así que los pájaros habían desarrollado resistencia al veneno. En 1889, Kaufmann (6) utilizando la serpiente europea *Vipera verus*, obtuvo resultados similares, y en 1892, Calmette (7) trabajando en Saigón con veneno de cobra, señaló que era posible proporcionar resistencia con un programa de inyecciones de veneno. Sin embargo, fue Kanthack (8) quien primero confirmó resistencia a otro animal cuando, al mezclar veneno con la sangre del animal inmunizado, demostró la resistencia a dosis letales del veneno de la serpiente.

El esquema básico de Calmette consistía en acostumar al animal a dosis repetidas, frecuentes, gradualmente crecientes de veneno (habitualmente veneno de cobra). Encontró que en un período de 16 meses los caballos inmunizados se volvían tolerantes a 80 veces la dosis letal de veneno. Mostró también que el antiveneno derivado de la sangre tomada de estos caballos tenía un efecto neutralizante de 20.000 unidades cuando se aplicaba a conejos, es decir que 1 ml de suero podía neutralizar la dosis letal mínima de veneno para un grupo de conejos que pesaban en total 20.000 gramos.

Los antivenenos más conocidos son concentrados refinados de globulinas de suero equino preparadas como líquido o como forma seca. Los antivenenos se obtienen a partir de caballos que han sido inmunizados frente a un veneno único, para producir un antiveneno monoespecífico, o una mezcla de un cierto número de venenos, para producir un antiveneno poliespecífico. Se han preparado antivenenos para tratamiento de la mayoría de tipos de envenenamiento con veneno de serpiente. Los métodos de producción han variado poco desde los tiempos de los investigadores pioneros del último siglo. El suero de caballo inmune se puede someter a una etapa de purificación del producto bruto empleando normalmente sulfato de amonio para precipitar la fracción globulina y en algunos casos esta es la forma del producto final. Dado que esta forma de antivenenos puede dar lugar a reacciones al suero graves, se emplea el conocido método de digestión con pepsina para separar la parte Fc de la inmunoglobulina que es responsable principalmente de estas reacciones inmunogénicas.

La eficacia de los antivenenos conocidos para neutralizar tanto los efectos deletéreos como los al parecer no-deletéreos de un veneno específico puede variar considerablemente y depende de una serie de factores. Los más importantes de estos factores son la especificidad del antiveneno, la concentración de anticuerpos producidos y el grado de concentración o purificación del producto final.

En general, cuanto más específico sea un antiveneno mayor será la probabilidad de neutralizar el veneno del reto. Por lo tanto, los antivenenos monoespecíficos, los obtenidos provocándolos ante un único veneno, son los más eficaces frente a su veneno homólogo. Sin embargo, estos antivenenos solamente se utilizan en el tratamiento de una mordedura de serpiente cuando se ha identificado la especie o subespecie de la serpiente atacante. Cuando no se ha identificado la serpiente atacante, como es el caso en una situación de "campo", se prefiere utilizar un antiveneno poliespecífico, provocado frente a un espectro de venenos diferentes, con el fin de mejorar la probabilidad de que el antiveneno sea eficaz frente al veneno de la serpiente no identificada. Los antivenenos poliespecíficos convencionales, sin embargo, carecen de la especificidad de los antivenenos monoespecíficos y son, por lo tanto, menos eficaces para neutralizar la actividad farmacológica de un veneno.

Delori y col. (Actas del 4° Simposio Int. sobre Toxinas Microb. Anim. Plantas, 1974 (Publicadas en 1976), 2, 407-20) describe la preparación de un antiveneno que comprende una mezcla de antisueros producidos frente a componentes individuales de un veneno.

5 La Solicitud de Patente internacional WO 91/06306 describe la preparación de antivenenos en animales no-mamíferos.

10 El solicitante ha hecho el inesperado y sorprendente descubrimiento de que un antiveneno (citado aquí como "antiveneno monoespecífico mixto") que comprende una mezcla de diferentes antisueros provocados de forma separada para diferentes venenos es más eficaz en la neutralización de la actividad farmacológica de un veneno que un antiveneno poliespecífico convencional preparado por producción de un antisuero único para un espectro de venenos, pero retiene la amplia especificidad de antivenenos poliespecíficos.

15 Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un antiveneno que comprende una mezcla de al menos dos antisueros ovinos diferentes producidos para diferentes venenos, donde cada veneno es un veneno total.

20 Se postula que los antivenenos que comprenden una mezcla de diferentes antisueros son más eficaces que los antivenenos poliespecíficos convencionales porque los primeros puede contener una proporción más alta de anticuerpos dirigidos frente a los componentes de peso molecular bajo y/o pobremente inmunogénicos de los venenos.

25 Los venenos de serpiente son mezclas multicomponentes complejas de proteínas, nucleótidos e iones metálicos. Estos componentes difieren en peso molecular, en su grado de antigenicidad y en su concentración en el veneno. Cuando el veneno se inyecta en un animal para obtener un antisuero, se puede producir un cierto número de poblaciones de anticuerpo. La concentración y las afinidades de los anticuerpos obtenidos variarán con arreglo a diversos criterios, por ejemplo al número de epitopes sobre la superficie del componente, la inmunogenicidad de cada epitope, la concentración de cada componente.

30 Los componentes neurotóxicos letales de los venenos (entre los que se incluyen por ejemplo venenos de serpiente cascabel) comprenden frecuentemente componentes de bajo peso molecular, pobremente inmunogénicos, presentes solamente en bajas concentraciones. Estos componentes es improbable que eliciten anticuerpos en alta concentración.

35 Se postula que este problema se agudiza en la producción de un antiveneno poliespecífico por utilización de una mezcla inmunizante que comprende una mezcla de venenos en los que los componentes de baja concentración, bajo peso molecular y pobremente inmunogénicos quedan diluidos además por componentes altamente inmunogénicos. La producción de un antiveneno poliespecífico da por resultado por lo tanto un antiveneno en que los anticuerpos para algunos componentes no existen o están en con-

40 centración tan baja que su eficacia es despreciable.

En contraste con esto, el antiveneno monoespecífico mixto de la presente invención comprende una mezcla de antisueros obtenidos frente a diferentes venenos en grupos de animales separados. Por provocación separada de los antisueros, el número de posibles poblaciones de anticuerpo que está disponible

45 para cada antisuero es el mismo pero el número de epitopes en el inmunógeno es significativamente menor. Según esto, se postula que los antisueros componentes contienen una proporción más elevada de anticuerpos protectores frente a componentes de bajo peso molecular y pobremente inmunogénicos que los antivenenos poliespecíficos. La combinación de los antisueros monoespecíficos para producir un antisuero monoespecífico mixto da por resultado un antiveneno que tiene todas las poblaciones del suero monoespecífico, y por lo tanto proporciona una mejor protección, pero también tiene las ventajas de un

50 antiveneno poliespecífico en el que se ha hecho máxima la reactividad cruzada del antiveneno.

Hay que hacer notar que cada antiveneno componente del antiveneno monoespecífico mixto de la presente invención puede él mismo ser un antiveneno monoespecífico o un antiveneno poliespecífico. Por ejemplo, el antiveneno monoespecífico mixto puede comprender una mezcla de un antiveneno poliespecífico provocado frente a venenos A + B y un antiveneno monoespecífico obtenido para veneno C.

55

Preferiblemente, cada antiveneno componente es un antiveneno monoespecífico. Por ejemplo, el antiveneno monoespecífico mixto puede comprender una mezcla de antivenenos monoespecíficos provocados para venenos A, B y C.

60

Los antisueros que comprenden el antiveneno monoespecífico mixto pueden mezclarse en cualquier

proporción adecuada. Preferiblemente, el antiveneno mono específico mixto contiene antisueros mezclados en una proporción apropiada al área geográfica en la que se va a utilizar el antiveneno mono específico mixto. Los factores a tener en cuenta cuando se produce este antiveneno mono específico mixto "indicado" son la población, distribución, conducta y toxicidad de un animal venenoso particular dentro de un área particular.

La composición del antiveneno mono específico mixto puede determinarse por un análisis estadístico de las mordeduras a humanos en un área geográfica particular por una especie o subespecie particular de un animal venenoso. Preferiblemente, cada antisuero componente del antiveneno mono específico mixto está presente en proporción directa a la frecuencia relativa de mordeduras sobre humanos en un área geográfica particular por una especie o subespecie particular de un animal venenoso frente a cuyo veneno se ha provocado el antisuero.

Por ejemplo, la serpiente cascabel tortuga acuática está separada en dos tipos geográficos conocidos como la tortuga acuática del Este (*C. adamanteus*) y la del Oeste (*C. atrox*). Se puede producir por tanto un antiveneno mono específico mixto que sirva para las serpientes de un área geográfica particular. No es, por tanto necesaria la inclusión de antisueros frente a serpientes que no se encuentran en ese área, que pueden diluir la eficacia de un producto. Esta capacidad para producir antivenenos indicados permite a los antivenenos mono específicos mixtos de la presente invención aproximarse o incluso superar la eficacia de un antiveneno homólogo mono específico sin conocer la serpiente atacante por compensación estadística de los tipos de mordedura de serpiente en un área geográfica.

Los antisueros que comprenden el antiveneno son de oveja. La provocación de antisueros en ovejas es particularmente ventajosa sobre el método tradicional de provocación de antisueros en caballos, ya que los antisueros provocados en ovejas no contienen ninguno de los componentes de IgG e IgG(T) particularmente inmunogénicos de los antisueros de caballo que dan lugar a reacciones de suero inmunogénicas indeseables en personas o en animales a los que se administra el antiveneno.

Los antisueros que comprenden el antiveneno pueden ser antisueros completos. Preferiblemente, los antisueros pueden estar parcialmente digeridos para tener fragmentos F(ab') o F(ab). La separación del fragmento Fc es ventajosa al reducir la reacción inmunogénica del paciente al antiveneno. La preparación de fragmentos de anticuerpo puede llevarse a cabo por técnicas convencionales, por ejemplo por digestión con pepsina o papaína (15).

Los antisueros que comprenden el antiveneno pueden ser provocados frente al veneno de un animal venenoso, entre los que se incluyen serpientes, lagarto gila, arañas y abejas. El antiveneno puede comprender antisueros provocados para el veneno de un solo tipo de animal, por ejemplo, antisueros provocados para el veneno de diferentes especies o subespecies de serpiente. Alternativamente, el antiveneno puede comprender antisueros provocados frente al veneno de más de un tipo de animal. Preferiblemente, el veneno es veneno de serpiente. Más preferiblemente el veneno es veneno de serpiente cascabel.

El veneno frente al que se provoca cada antisuero puede consistir en veneno total o veneno parcialmente purificado. Preferiblemente, el veneno comprende veneno completo.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de un antiveneno según el primer aspecto de la invención que comprende la mezcla de al menos dos antisueros diferentes.

Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de antiveneno según el primer aspecto de la presente invención en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Preferiblemente, la composición farmacéutica es adecuada para la administración parenteral a un paciente. Más preferiblemente, la composición farmacéutica es adecuada para inyección intravenosa.

Según un cuarto aspecto de la presente invención se proporciona un estuche con un equipo de administración del antiveneno a una persona o animal que comprende:

- (a) un antiveneno según el primer aspecto de la presente invención, y
- (b) medios para inyectar el antiveneno en el cuerpo.

La invención se describirá a continuación utilizando ejemplos con referencia a las Figuras en las que:

La Figura 1 ilustra la actividad de fosfolipasa A2 en 1 μ g de cuatro venenos de crotálidos; y

La Figura 2 ilustra la cantidad de antiveneno necesario para neutralizar el 50% de la actividad de fosfolipasa A2 en 1 μ g de veneno de crotálidos.

⁵ *Parte experimental*

1. Preparación de antivenenos

¹⁰ Se produjo un antiveneno por inmunización de un grupo de 10 ovejas de Gales mestizas con un veneno siguiendo el esquema de inmunización convencional de Sidki y col. (11). El veneno para la inmunización fue proporcionado por el Profesor F. Russell de la Universidad de Arizona. El veneno se había recogido de un gran número de serpientes de la misma especie. Se habían incluido individuos de diferente edad y localización geográfica y se había recogido el veneno a lo largo del año. Se sabe que estos factores influyen en la composición del veneno y son, por tanto, importantes para la producción eficaz de antiveneno. Se ¹⁵ recogió sangre (-300 ml) de este grupo y se acumuló mensualmente, separando el suero por aspiración después de dejar formarse un coágulo a 4°C durante 18 horas.

	Semana	Fecha de la inmunización	Inmunógeno mg/oveja	Fecha de la toma de muestra
20	0	Inmunización primaria	0,5	
	1			
25	2			Muestra 1
	3			
	4	Re-inmunización 1	1,0	
	5			
30	6			Muestra 2
	7			
	8	Re-inmunización 2	2,0	
	9			
35	10			Extracción de sangre 1
	11			
	12	Re-inmunización 3	4,0	
	13			
40	14			Extracción de sangre 2
	15			
	16	Re-inmunización 4	4,0	
	17			
45	18			Extracción de sangre 3
	19			
50	20	Re-inmunización 5	4,0	

⁵⁵ Se produce un concentrado de IgG a partir del acumulado de antisuero por precipitación con sulfato de sodio. La fracción de inmunoglobulina se purifica parcialmente entonces por precipitación con sulfato de sodio desde el acumulado de antisuero. Se mezclan volúmenes del antisuero con volúmenes iguales de sulfato de sodio al 36% y la mezcla resultante se agita durante 1,5 horas a temperatura ambiente para permitir la precipitación de la inmunoglobulina. Después de la centrifugación a 3500 rpm durante 60 minutos, se lava el aglomerado dos veces con sulfato de sodio al 18% y el aglomerado final se reconstituye entonces con solución salina tamponada con fosfato (PBS), hasta un volumen igual al de la acumulación de antisuero inicial. Se dializa entonces la solución frente a 20 volúmenes de PBS y el producto se almacena a 4°C hasta que se necesite. ⁶⁰

El producto se puede someter a análisis por el método micro-Kjeldahl (14) para determinar la concentración exacta de proteínas de la muestra. Si se requiere, se puede llevar a cabo la digestión de esta IgG

para formar el $F(ab')_2$ y $F(ab)$ utilizando pepsina o papaína respectivamente. Estos productos pueden analizarse también por SDS PAGE (13), micro-Kjeldahl y ELISA (12) para asegurarse que mantienen la potencia.

5 2. Comparación de antivenenos *in vitro*

2.1 Introducción

El veneno de serpiente es una mezcla multi-componente de proteínas, iones metálicos y nucleótidos. Aunque la naturaleza exacta de un veneno particular depende del genotipo de la serpiente, existen algunas proteínas comunes.

Una de estas proteínas comunes es la enzima fosfolipasa A2 (PLA2). Esta enzima es responsable en primer lugar de la degradación de la grasa corporal pero puede tener otra serie de actividades distintas tales como ruptura de células (a través de liso-productos de hidrólisis de grasas) así como neurotoxicidad (mediada por una sede farmacológicamente activa sobre la enzima).

La actividad de PLA2 en venenos de crotálicos o serpientes cascabel puede comprobarse utilizando un simple ensayo colorimétrico. La PLA2 hidroliza grasas para producir ácido graso y glicerina dando lugar a una caída del pH del sistema.



Este descenso del pH puede seguirse por incorporación de un indicador de pH coloreado al sistema.

25

2.2 Comprobación de la actividad de PLA2

El siguiente ensayo se puede utilizar para hacer el seguimiento de la actividad de fosfolipasa A2 (PLA2, EC3.1.1.4) de venenos particulares. La actividad se comprueba por medida de la liberación de ácido graso libre desde el sustrato de fosfolípido (fosfatidil-colina, Sigma Chemical Company, número del producto P-9671 utilizando un indicador de pH (rojo Cresol, Sigma Chemical Company, número del producto C-9877).

Tampón para el ensayo:

- 35 1. NaCl 100 mM
2. KCl 100 mM Todos calidad de reactivo GPR
3. $CaCl_2$ 10 mM

Para un ensayo de rutina se llevan 500 ml de esta solución a pH 8,6 utilizando una solución de hidróxido de sodio diluida.

Preparación del indicador:

Se disuelven 10 mg de rojo cresol (sal sódica, Sigma N°. C-9877) en tampón para ensayo (10 ml) y se envuelve el recipiente en hoja de estaño.

Preparación del sustrato:

Se disuelve fosfatidilcolina (1,2 g de yema de huevo tipo XV-E, 60%, forma L-alfa, Sigma N°. P9671) en metanol (1 ml) y se lleva la solución hasta 10 ml con tampón de ensayo (concentración final 120 mg/ml). Esta solución deberá obtenerse reciente para cada grupo de experimentos.

Método:

Se disuelve un veneno monovalente desecado por congelación, bruto, en agua destilada hasta una concentración final de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se hace una preparación de rutina de 10 ml de solución de veneno para cada grupo de experimentos. La solución sustrato se prepara entonces de la siguiente forma:

A 1 ml de la suspensión de lípido recién preparada, se añaden 25 ml de tampón de ensayo seguido de 0,3 ml de Triton-X-100 (BDH N°. 30632). Triton es una marca registrada. Se mezcla a fondo la solución hasta que se vuelve transparente. Se ajusta el pH a 8,6 utilizando hidróxido de sodio diluido. Se añade 1 ml de la solución de indicador preparada y se lleva la solución de sustrato hasta un volumen

final de 30 ml con tampón de ensayo. (La solución sustrato deberá ser de color rojo, si no lo es habrá de comprobarse el pH del tampón de ensayo). Esta solución se cubrirá también con papel de plata.

A 2,8 ml de solución sustrato en una cubeta de plástico de 3 ml, se añaden 100 μ l de tampón de ensayo y se mide la OD_{573nm}. Se añaden 100 μ l de solución de veneno y se pone en marcha el cronómetro. A una segunda cubeta con 2,8 ml de solución sustrato y 100 μ l de tampón de ensayo, se añaden otros 100 μ l de tampón de ensayo con el fin de seguir cualquier posible caída de pH de fondo. Con esta se trabaja al mismo tiempo que con la cubeta de ensayo. Se toman lecturas cada minuto a lo largo de un período de 30 minutos. Se traza entonces un gráfico de la OD en función del tiempo teniendo en cuenta la caída del pH de fondo de la muestra de control y restando este valor del causado por adición del veneno. Estas lecturas se expresan como porcentaje de la lectura de control normalizada.

2.3 Estudios de neutralización

Se llevan a cabo experimentos de neutralización utilizando cortes de IgG de los correspondientes antisueros. Estas preparaciones se obtuvieron por precipitación con sal del antisuero completo (sulfato de sodio al 18%, 25°C durante 1,5 horas).

El ensayo y los tampones sustrato utilizados para estos estudios son idénticos a los de los experimentos anteriores.

Se vuelve a diluir entonces una dilución de 1 a 10 del antiveneno en el tampón de ensayo (solución de reserva) a diluciones dobles y se añaden partes alícuotas de 100 μ l a 100 μ l de la solución de veneno específico (10 μ g/ml). Se hizo el seguimiento de dos juegos de muestras adicionales en cuanto a la caída del pH de fondo (200 μ l de tampón de ensayo) e hidrólisis total (100 μ l de tampón de ensayo y 100 μ l de solución de veneno). Se incuban entonces las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente. Durante este período se prepara la solución sustrato y se comprueba su pH.

Se mide entonces la OD del tiempo cero de partes alícuotas de 2,8 ml de solución sustrato. Esto se realiza inmediatamente antes de la adición de 200 μ l de la solución veneno/antiveneno (después del período de incubación de 30 minutos). Se dejan 15 minutos más de incubación a temperatura ambiente y se lee entonces la OD. Los resultados se procesan entonces tal como se ha descrito antes, y se expresan como neutralización en porcentaje de la hidrólisis inducida por veneno.

Resultados

Los anteriores ensayos se llevaron a cabo utilizando cuatro venenos de serpientes cascabel, *A. piscivorous*, *C. adamanteus*, *C. atrox* y *C. scutulatus*.

La Figura 1 demuestra que cada uno de los venenos contiene enzimas PLA2 potentes y muestra que el orden de actividad es *A. piscivorous* > *C. adamanteus* = *C. scutulatus* > *C. atrox*.

Se confirma entonces la capacidad de neutralización del antiveneno descrito antes.

Se llevaron a cabo estudios de neutralización utilizando un antiveneno monoespecífico mixto preparado por mezcla de volúmenes iguales de igual concentración de las IgG específicas obtenidas por inmunización de cuatro grupos de ovejas frente al veneno de *A. piscivorous*, *C. adamanteus*, *C. atrox* y *C. scutulatus*. Las concentraciones se determinaron por el método Kjeldal de análisis de nitrógeno y se hicieron iguales por adición de cantidades adecuadas de PBS.

Se llevaron a cabo también estudios de neutralización de control utilizando antivenenos monoespecíficos provocados ante cada uno de los venenos y utilizando antiveneno poliespecífico provocado frente a una mezcla de 1:1:1:1 de los venenos. En los experimentos de control se utilizaron protocolos exactamente análogos, incluyendo fuentes de veneno, inmunización, purificación y protocolos de ensayo, a los del experimento de antiveneno monoespecífico mixto.

Los resultados se muestran en la Figura 2 que muestra que el antiveneno monoespecífico mixto es de potencia mayor o igual al correspondiente antisuero poli-específico para la neutralización de la actividad de PLA2 de veneno. Efectivamente, para tres de los cuatro venenos ensayados, se requirió significativamente menos antiveneno para alcanzar una neutralización del 50%.

Además, el antiveneno monoespecífico mixto era también de potencia similar o más grande que el

antiveneno monoespecífico homólogo, lo que demuestra que el antiveneno monoespecífico mixto tenía un alto grado de actividad cruzada.

Estos resultados conducen a la sorprendente conclusión de que en el caso de neutralización de PLA2, el antisero monoespecífico mixto es más potente que su contrapartida poliespecífica.

Referencias

1. Karlsson, E. (1979) Química de toxinas de proteína en venenos de serpientes. En "Snake Venoms", Capítulo 5, Handbook of Experimental Pharmacology N°. 5, Editado por C.Y. Lee, Springer-Verlag, Nueva York.
2. Tu, A.T. (1982) "Rattlesnake Venoms, Their Action and Treatment" (Venenos de serpiente cascabel, su acción y tratamiento), Capítulo 1, Marcel Dekker Inc., Nueva York.
3. Russell, F.E. (1983) "Snake Venoms Poisoning" (Envenenamiento con veneno de serpiente) Segunda Edición. Great Neck. Nueva York.
5. Sewall, H. (1887) Experimentos sobre la inoculación preventiva de veneno de serpiente. *J. Physiol.*, 8, 203.
6. Kaufman, M. (1986) *Du Venom Vipere*, Masson, París.
7. Calmette, A. (1892) Estudio experimental del veneno de *Naja tripuians*, *Ann. Institut Pasteur*, 6, 160.
8. Kanthack, A.A. (1897) Informe sobre el veneno de serpiente en su relación profiláctica con los venenos de la misma o de distinta especie, *Rep. Med. Local Govt. Bd.*, 1895-6, Londres.
9. Calmette, J. (1907) *Les Venins Animaux et la Serotherapie Antivenimeuse* (Los venenos animales y la seroterapia antivenenosa), Masson, París.
11. Sidki, A.M. Al Abdullah, I.H. y Rowell, F.J. (1987), Quinina determinada directamente en suero u orina por fluoroinmunoensayo de separación. *Clin. Chem.* 33, 463.
12. Theakston, R.D.G. (1983) La aplicación de las técnicas de inmunoensayo incluyendo ELISA, a la investigación de venenos de serpientes. *Toxicon*, 21, N°. 3, 352.
13. Laemmli, U. (1970) *Nature*, 227, 680.
14. Grimble, G.K. (1990) *Clin. Lab Practice* 39, N°. 4, 71
15. Lamoyi E. y Nisonoff A. (1983) *J. Immunol. Meth.*, 56, 235. Porter R.R. (1959) *Biochem. J.*, 73, 119.

REIVINDICACIONES

1. Un antiveneno que comprende una mezcla de al menos dos antisueros ovinos provocados frente a diferentes venenos, donde cada veneno es un veneno completo.

2. Un antiveneno según la reivindicación 1 donde cada antisuero componente es un antiveneno monoespecífico.

3. Un antiveneno según las reivindicaciones 1 ó 2 donde cada antisuero comprende fragmentos $F(ab')_2$ o $F(ab)$ obtenibles por digestión parcial de IgG del suero completo.

4. Un antiveneno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde cada antisuero está presente en una proporción relacionada con la toxicidad y frecuencia de mordeduras a seres humanos en un área geográfica particular por el particular animal venenoso frente a cuyo veneno se provoca cada antisuero.

5. Un antiveneno según la reivindicación 4 donde cada antisuero componente está presente en proporción directa a la frecuencia relativa de mordeduras a seres humanos en un área geográfica particular por la especie o subespecie particular del animal venenoso frente a cuyo veneno se provoca cada antisuero.

6. Un antiveneno según cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde cada antisuero se provoca frente a veneno de serpiente.

7. Un antiveneno según la reivindicación 6 donde cada antisuero se provoca frente a veneno de serpiente cascabel.

8. Un procedimiento para la preparación de antiveneno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la mezcla de al menos dos antisueros diferentes.

9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un antiveneno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

10. Un estuche con un equipo para administración de antiveneno a una persona o a un animal que comprende:

(a) un antiveneno según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y

(b) medios para inyección del antiveneno en el cuerpo.

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

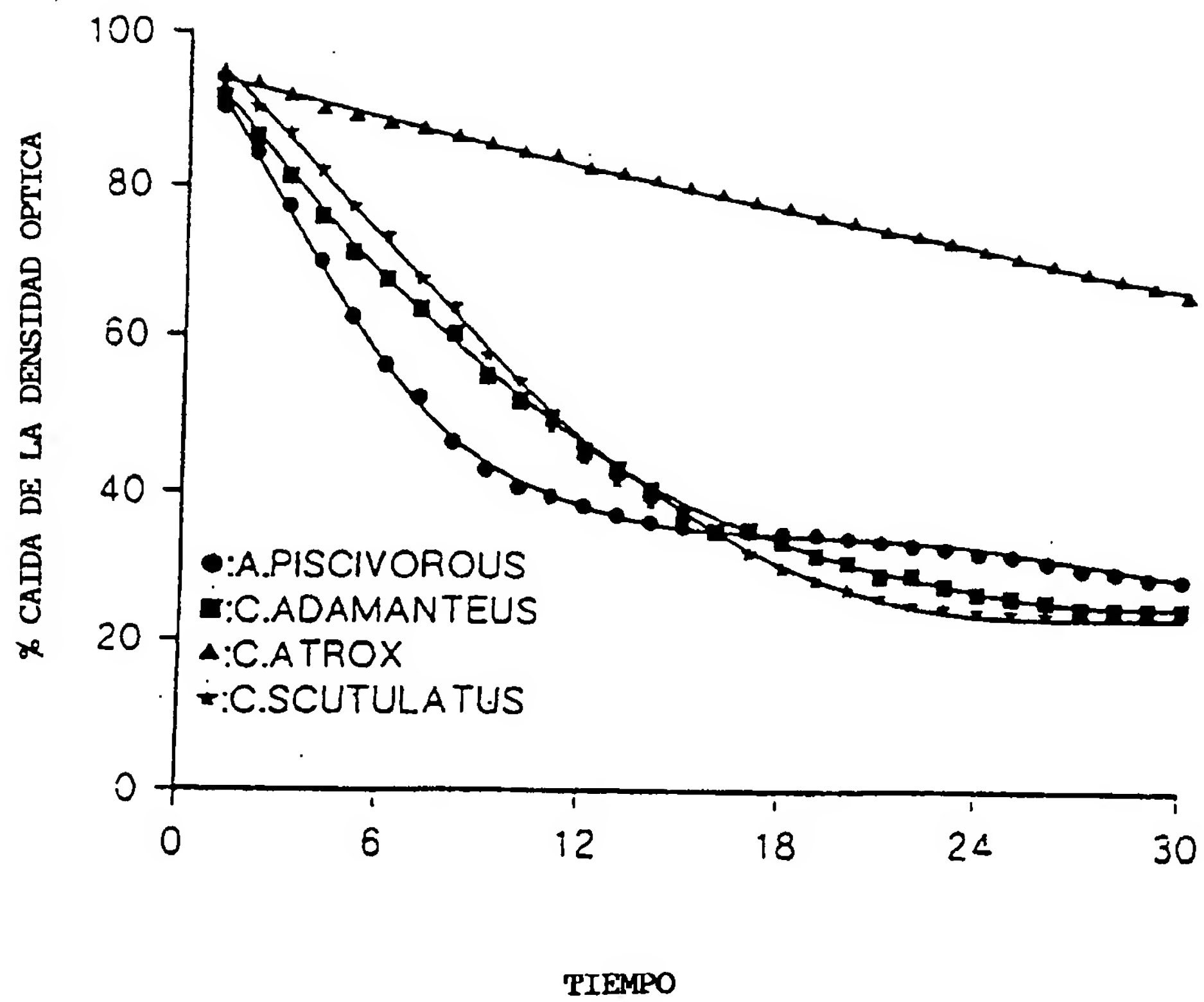


FIG. 1

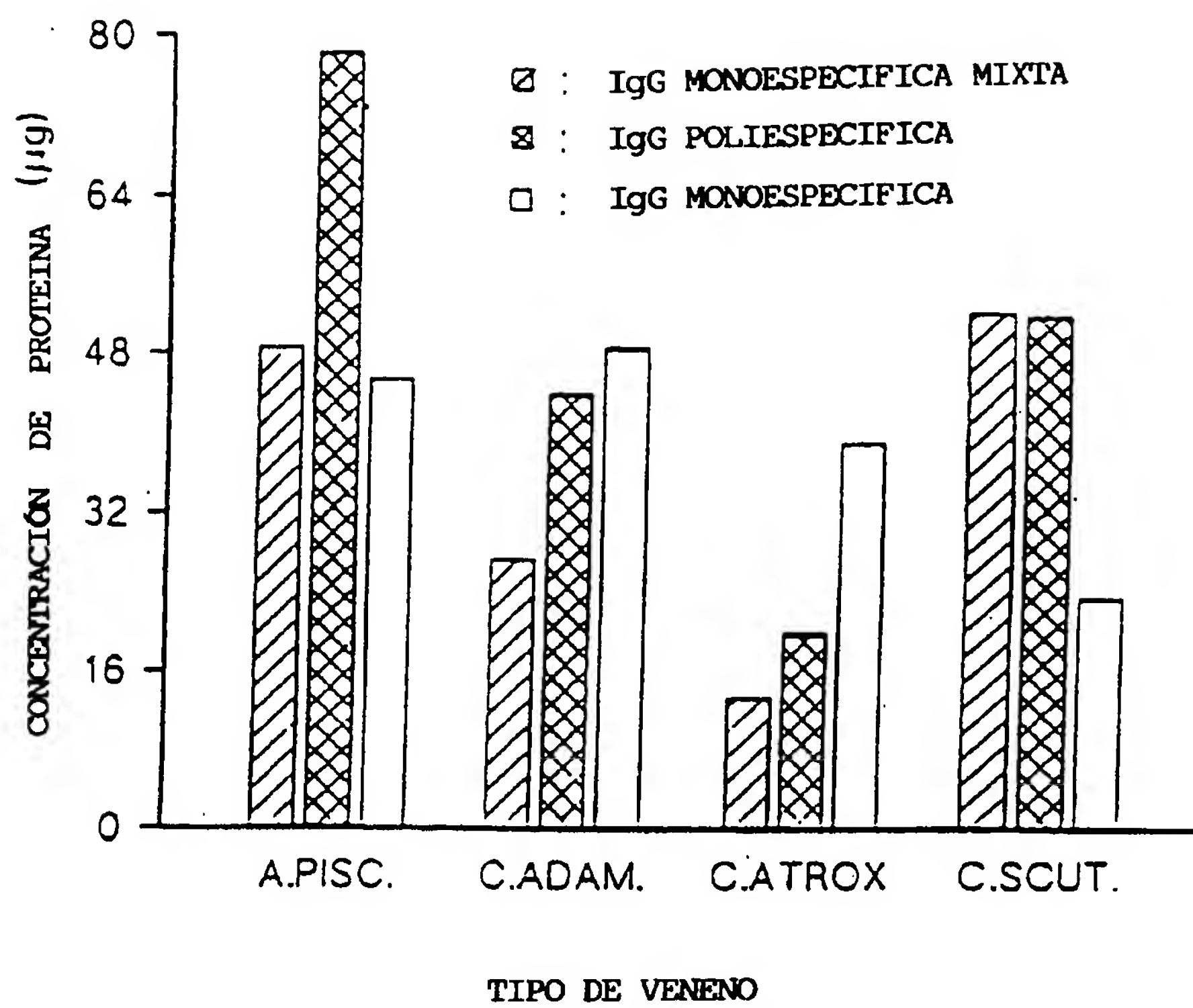


FIG. 2

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.